

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-266864
 (43)Date of publication of application : 05.10.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C12M 1/00
 G01N 35/10

(21)Application number : 10-070201
 (22)Date of filing : 19.03.1998

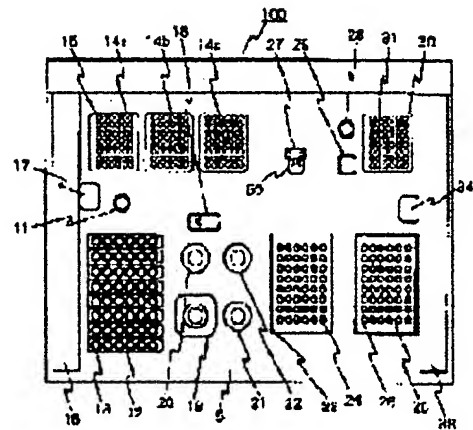
(71)Applicant : HITACHI LTD
 (72)Inventor : SAKURAI TOMOYA
 YASUDA KENJI
 MATSUMOTO KOICHI

(54) PURIFICATION OF NUCLEIC ACID AND DEVICE FOR PURIFICATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for purifying a nucleic acid, capable of readily carrying out a process for catching the nucleic acid into a solid phase, a process for washing the caught nucleic acid and a process for eluting the caught and washed nucleic acid by the use of a chip having a solid phase built therein by detachably connecting the chip having the silica-containing solid phase built therein and used for catching the nucleic acid to a movable nozzle for sucking or releasing a liquid.

SOLUTION: A chip 31 having a silica-containing solid phase built therein and used for catching nucleic acid is detachably connected to a movable nozzle for sucking or releasing liquid, and the movable nozzle can be moved with a nozzle holder 34 in the horizontal direction and in the longitudinal direction of an arm 33. A liquid mixture of a substance (guanidine hydrochloride, etc.) for accelerating the bonding of the nucleic acid to the solid phase with a specimen containing the nucleic acid is sucked into the chip for catching the nucleic acid to bind the nucleic acid to the solid phase, and the liquid is discharged. A washing liquid is sucked and subsequently discharged. An elution solution containing the nucleic acid is sucked and then discharged into a container 26 for the purified product.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.01.2001
 [Date of sending the examiner's decision of rejection]
 [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
 [Date of final disposal for application]
 [Patent number]
 [Date of registration]
 [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
 [Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-266864

(43) 公開日 平成11年(1999)10月5日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 M 1/00

C 1 2 M 1/00

A

G 0 1 N 35/10

G 0 1 N 35/06

F

G

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号

特願平10-70201

(22) 出願日

平成10年(1998)3月19日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 桜井 智也

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 保田 健二

茨城県ひたちなか市大字市毛882番地 株式会社日立製作所計測器事業部内

(72) 発明者 松本 孝一

茨城県ひたちなか市大字津田字関場1939 那珂インストルメンツ株式会社内

(74) 代理人 弁理士 高田 幸彦 (外1名)

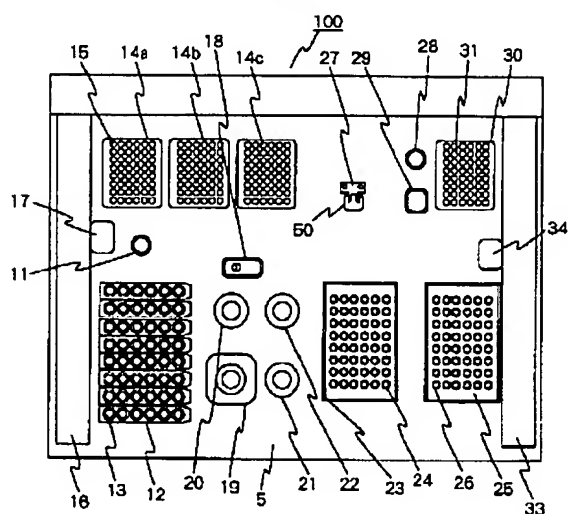
(54) 【発明の名称】 核酸の精製方法および精製用装置

(57) 【要約】

【課題】 核酸を含有する試料から精製度の高い核酸を回収するための自動化装置を提供する。

【解決手段】 ノズルに接続した分注用チップ15を用いて検体及び結合促進剤を処理容器24に供給し、処理容器内の混合液を核酸捕捉用チップ31内に吸入して該チップに内蔵される固相により核酸を捕捉する。固相洗浄後の核酸捕捉用チップ内に溶離液を吸入し、溶出された核酸を含む液を精製品用容器26に回収する。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】核酸を含有する試料から核酸を精製する方法において、

シリカ含有の固相を内蔵した核酸捕捉用チップを、液体吸排用可動ノズルに着脱可能に接続すること、
上記固相への核酸の結合を促進する物質と核酸含有試料との混合液を、所定容器内から上記液体吸排用可動ノズルに接続された核酸捕捉用チップ内に吸入すること、
吸入された混合液中の核酸を上記固相に結合させた後、
上記核酸捕捉用チップ内の液体を排出すること、
液体排出後の上記核酸捕捉用チップ内に洗浄液を吸入し、次いで該洗浄液を上記核酸捕捉用チップから排出することにより、核酸を結合した状態の上記固相及び上記核酸捕捉用チップ内を洗浄すること、及び洗浄後の上記核酸捕捉用チップ内に溶離液を吸入し、上記固相から離脱された核酸を含む溶離液を精製品用容器に吐出すること、を特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 2】請求項 1 記載の精製方法において、処理対象の試料が変わる毎に上記液体吸排用可動ノズルに接続する上記核酸捕捉用チップを新しいものに変換することを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 3】請求項 1 記載の精製方法において、上記混合液を、上記核酸捕捉用チップ内に吸入後に一旦上記所定容器に吐出し、次いで再び同じ核酸捕捉用チップ内に吸入して上記混合液と上記固相との接触回数を複数回にすることを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 4】請求項 1 記載の精製方法において、上記固相及び上記核酸捕捉用チップ内を洗浄する工程では、最初の洗浄液を上記核酸捕捉用チップから排出した後、新たな洗浄液を上記核酸捕捉用チップ内に吸入し排出することを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 5】請求項 1 記載の精製方法において、液体搬送用ノズルに液体分注用チップを着脱可能に接続し、該液体分注用チップを用いて洗浄液ボトルから上記所定容器に洗浄液を分注し、該所定容器に分注された洗浄液を上記核酸捕捉用チップ内に吸入することを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 6】請求項 1 記載の精製方法において、液体搬送用ノズルに液体分注用チップを着脱可能に接続し、該液体分注用チップを用いて溶離液ボトルから上記所定容器に溶離液を分注し、該所定容器に分注された溶離液を上記核酸捕捉用チップ内に吸入することを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 7】請求項 6 記載の精製方法において、上記液体分注用チップは、上記所定容器に対し溶離液を複数回に分けて分注し、上記核酸捕捉用チップは、上記所定容器から溶離液を複数回吸入することを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 8】請求項 1 記載の精製方法において、上記結合促進物質は、塩酸グアニジンであることを特徴とする

核酸の精製方法。

【請求項 9】請求項 1 記載の精製方法において、上記洗浄液は、エチルアルコール水溶液であることを特徴とする核酸の精製方法。

【請求項 10】核酸を含有する試料から核酸を精製するための装置において、

シリカ含有の固相を液体に接触可能に内蔵した核酸捕捉用チップと、
該核酸捕捉用チップを着脱可能に接続する液体吸排用可動ノズルと、

上記固相への核酸の結合を促進する物質と核酸含有試料との混合液を収容し得る処理容器と、
上記処理容器へ洗浄液を供給する手段と、
上記処理容器へ溶離液を供給する手段と、
核酸の精製品を受け入れるための精製品用容器と、
未使用状態の上記核酸捕捉用チップを上記液体吸排用可動ノズルに接続せしめ、接続状態にある上記核酸捕捉用チップを上記処理容器及び上記精製品用容器の位置へ移動せしめる搬送手段と、
上記液体吸排用可動ノズルに接続されている上記核酸捕捉用チップに、上記混合液を吸排せしめた後、上記洗浄液を吸排せしめ、その後上記溶離液を吸排せしめる液体吸排作用手段と、

上記核酸捕捉用チップから上記精製品用容器へ溶離液を吐出した後に、上記液体吸排用可動ノズルから上記核酸捕捉用チップを取り外すチップ取り外し手段と、を備えたことを特徴とする核酸の精製用装置。

【請求項 11】請求項 10 記載の精製用装置において、上記核酸捕捉用チップは、該核酸捕捉用チップ内の上記固相が外部に流出することを阻止するための流体流通可能な阻止部材を具備することを特徴とする核酸の精製用装置。

【請求項 12】請求項 11 記載の精製用装置において、上記阻止部材は、ポリビニリデンフロライドにより形成されていることを特徴とする核酸の精製用装置。

【請求項 13】請求項 11 記載の精製用装置において、上記阻止部材は、上記核酸捕捉用チップにおける上記固相の内蔵領域よりも上記液体吸排用可動ノズルとの接続端側に配置されており、挿入用補助ガイドが形成されていることを特徴とする核酸の精製用装置。

【請求項 14】請求項 10 記載の精製用装置において、上記処理容器へ上記試料及び上記結合促進物質を分注するための液体分注用チップを備えることを特徴とする核酸の精製用装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸の精製方法および精製用装置に係り、特に、生物試料に含まれる核酸を共存物質から分離して取り出すのに適した方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】分子生物学の進歩によって、遺伝子に関する数々の技術が開発され、また、それらの技術により多くの疾患性の遺伝子が分離され、同定された。その結果、医療の分野でも、診断、或いは、検査法に分子生物学的な技術法が取り入れられ、従来不可能であった診断が可能となったり、検査日数の大幅短縮が達成されつつある。

【0003】このような進歩は、核酸増幅法、特に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR法と称される、polymerase chain reaction）の実用化によるところが大きい。PCR法は、溶液中の核酸を配列特異的に増幅することが可能なため、例えば、血清中に極微量しか存在しないウイルスを、そのウイルスの遺伝子である核酸を増幅し検出することにより、間接的に証明できる。しかし、このPCR法を臨床の場で日常検査に使用した際に、いくつかの問題点が存在する。その中でも特に、前処理における核酸の抽出、精製工程が精度維持のために重要である。核酸の精製に関しては、いくつかの手法が提案されている。

【0004】特開平2-289596号公報は、カオトロピック物質の存在下で核酸と結合することが可能なシリカ粒子を、核酸結合用固相として使用することを教示している。この特開平2-289596号公報には、シリカ粒子の懸濁液とカオトロピック物質としてのグアニジチオシアネート緩衝液とが入った反応容器に、核酸を含む試料を加えて混合し、核酸がシリカ粒子に結合された複合体を遠心分離した後、上清を廃棄し、残った複合体に洗浄液を加えてボルテックスミキサーを使用して洗浄し、再沈殿した複合体をエタノール水溶液で洗浄した後アセトンで洗浄し、アセトン除去して乾燥した複合体に溶離用緩衝液を加えて核酸を溶離して回収する精製方法が記載されている。

【0005】また、特開平8-320274号公報は、単一検体のために多数の容器と分注チップを用いてDNAを単離する方法を教示している。この特開平8-320274号公報には、次の点が記載されている。すなわち、移動機構によって移動されるピペットノズルに第1チップを装着し、その第1チップ内に検体を吸引する。次いで、第1チップの下端に血球の殻を取るフィルタを嵌合し、該フィルタを通して第1チップ内の検体を第1容器へ吐出する。その後、ピペットノズルからフィルタ及び第1チップを取り外し、ピペットノズルの下端に第2チップを装着し、第1容器内の検体を第2チップ内に吸引する。次いで、第2チップの下端にDNAを捕獲するためのシリカメンブランフィルタを嵌合し、第2チップ内の検体をシリカメンブランを通して第2容器へ吐出することによりシリカメンブランでDNAを捕獲すると共に夾雑物を第2容器に吐出する。その後、ピペットノズルを洗浄液が収容された第3容器まで移送し、DNA

を捕獲したシリカメンブランフィルタを第2チップから取り外して、第3容器の洗浄液中に浸漬する。次いで、第2チップを取り外したピペットノズルに第3チップを装着し、第3チップ下端に第3容器内のシリカメンブランフィルタを嵌合し、第3チップ内に洗浄液とDNAの混合液を吸引した後、その混合液を第4容器内に吐出する。

【0006】さらに、特開平7-250681号公報は、ガラスパウダー層を2枚のガラス繊維フィルタとメンブランフィルタで挟んだ四重構造の濾過部材を有するカートリッジ容器を用いてDNA抽出液を精製する方法を教示している。この特開平7-250681号公報では、調製されたDNA含有培養液を前処理しトラップフィルタに形質転換体を集菌し、溶菌用試薬を添加してプラスミドDNAを細胞外に溶出させたものを精製用試薬とする。精製工程では、カートリッジ容器に精製用試薬とカオトロピックイオン生成用試薬（ヨウ化ナトリウム）を添加し、カートリッジ容器に真空減圧又は遠心分離処理を施しカートリッジ容器のガラスパウダー層にプラスミドDNAを吸着させる。次いで、カートリッジ容器に洗浄用緩衝液を添加して真空減圧又は遠心分離処理により洗浄し、その後、カートリッジ容器に溶出用緩衝液を添加して真空減圧又は遠心分離操作を施し、プラスミドDNAのみを溶出する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上述した先行技術の内、特開平2-289596号公報の方法は、遠心分析操作が必要なため精製工程の自動化が困難である。また、特開平7-250681号公報の方法は、真空減圧又は遠心分離操作を複数回行われなければならないため自動化が困難である。さらに、特開平8-320274号公報の方法は、シリカメンブランを通して検体を第2チップ内から吐出するときにDNAを捕獲するように構成されているため、検体とシリカメンブランの接触時間が短くDNAの捕捉率が低い。

【0008】本発明の目的は、自動化が容易であるにもかかわらず、核酸捕捉時の試料と固相との接触時間を十分に確保できる核酸の精製方法及び精製用装置を提供することにある。

【0009】また、本発明の目的は、核酸の固相への捕捉、捕捉物の洗浄および捕捉物の溶離の各工程を、液体が吸排される1つの固相内蔵チップを用いて実行可能である核酸の精製方法および精製用装置を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明に基づく核酸の精製方法は、シリカ含有の固相を内蔵した核酸捕捉用チップを、液体吸排用可動ノズルに着脱可能に接続すること、固相への核酸の結合を促進する物質と核酸含有試料との混合液を、所定容器内から上記液体吸排用可動ノズ

ルに接続された核酸捕捉用チップ内に吸入すること、吸入された混合液中の核酸を固相に結合させた後、核酸捕捉用チップ内の液体を排出すること、液体は排出後の核酸捕捉用チップ内に洗浄液を吸入し、次いで該洗浄液を核酸捕捉用チップから排出することにより、核酸を結合した状態の固相及び核酸捕捉用チップ内を洗浄すること、及び洗浄後の核酸捕捉用チップ内に溶離液を吸入し、固相から離脱された核酸を含む溶離液を精製品用容器に吐出すること、を特徴とする。

【0011】本発明の望ましい実施例では、処理対象の試料が変わる毎に液体吸排用可動ノズルに接続する核酸捕捉用チップが新しいものに交換される。また、核酸捕捉用チップ内への試料混合液の吸入工程では、一旦吸入した混合液を元の所定容器に吐出して再び核酸捕捉用チップ内へ吸入することを繰り返し混合液と固相との接触回数を多くする。洗浄工程時の洗浄液及び溶離工程時の溶離液は、複数回に分けて核酸捕捉用チップに吸排される。

【0012】本発明に基づく核酸の精製用装置は、シリカ含有の固相を液体に接触可能に内蔵した核酸捕捉用チップと、該核酸捕捉用チップを着脱可能に接続する液体吸排用可動ノズルと、固相への核酸の結合を促進する物質と核酸含有試料との混合液を収容し得る処理容器と、この処理容器へ洗浄液を供給する手段と、処理容器へ溶離液を供給する手段と、核酸の精製品を受け入れるための精製品用容器と、未使用状態の核酸捕捉用チップを液体吸排用可動ノズルに接続せしめ、接続状態にある核酸捕捉用チップを処理容器及び精製品用容器の位置へ移動せしめる搬送手段と、液体吸排用可動ノズルに接続されている核酸捕捉用チップに、混合液を吸排せしめた後、洗浄液を吸排せしめ、その後に溶離液を吸排せしめる液体吸排作用手段と、核酸捕捉用チップから精製品用容器へ溶離液を吐出した後に、液体吸排用可動ノズルから核酸捕捉用チップを取り外すチップ取り外し手段と、を備えたことを特徴とする。

【0013】

【発明の実施の形態】核酸含有試料としては、全血、血清、喀痰、尿等の生体試料や培養細胞、培養細菌等の生物学的な試料、あるいは、電気泳動後のゲルに保持された状態の核酸、DNA増幅酵素等の反応産物や素精製状態の核酸を含む物質等を対象とすることができる。なお、ここでの核酸とは、2本鎖、1本鎖、あるいは部分的に2本鎖もしくは1本鎖構造を有するデオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA)を含む。

【0014】シリカ含有の固相への核酸の結合を促進する物質としては、核酸の吸収ピークがある260nmの波長付近の吸収が少ない物質が好ましい。なぜなら、核酸の純度や量の検定には、分光光度計により260nmの吸収を測定することが多いからである。また、チオシアン酸を含む物質は、酸と反応すると致死性のガスを発

生するため取り扱い上好ましくない。本発明の望ましい実施例では、これらの点を考慮し、カオトロピック剤として塩酸グアニジン(GuHCl)を用いる。塩酸グアニジンの使用時の最終濃度は、4~6mol/lであることが望ましい。

【0015】核酸捕捉用チップに内蔵されるシリカ含有固相としては、ガラス粒子、シリカ粒子、石英濾紙、石英ウール、あるいは、それら破砕物、ケイソウ土など、酸化ケイ素を含有する物質であれば使用することができるが、チップ外へ固相が出ないようにするために、チップ先端部の内径を小さくし、且つ、固相をチップ先端部内径よりも大きな外径を持たせる、或いは、チップ内の先端部付近に、固相の外径より孔径の小さい保持材を設置するなどにより、チップ内に試料を吸入したときに試料が固相に大きな接触面積で接触されるように、固相がチップ内に保持される。

【0016】核酸を固相から溶離する工程は、洗浄工程後の固相に対して低塩濃度の水溶液、或いは、水を混合することにより達成される。この操作により核酸は固相から水相へと移行するため、その水相を精製品用容器に回収することで精製済みの核酸水溶液が得られる。

【0017】以下、本発明に基づく一実施例である核酸精製用装置を図1~図7を参照して説明する。図1は一実施例の装置の平面図、図2はその外観図、図3は電気系のブロックダイアグラム、図4は核酸捕捉用チップを接続した分注器の概略図、図5は液体分注用チップの取り付け動作の説明図、図6はチップを取り外す動作の説明図、図7は核酸捕捉用チップの構成を示す図である。

【0018】図1及び図2において、核酸の精製用装置100は、水平方向(X方向)に移動可能な2本のアーム16、33を具備する。一方のアーム16には、分注ノズル36(図5)を保持するノズルホルダー17がアーム16の長さ方向に沿って水平方向(Y方向)に移動可能に取り付けられている。他方のアーム33には、液体吸排用可動ノズル39(図4)を保持するノズルホルダー34がアーム33の長さ方向に沿って水平方向(Y方向)に移動可能に取り付けられている。ノズルホルダー17、34は、対応するアーム16、33に対し、いずれも上下方向(Z方向)に動作できる。アーム16の水平移動領域とアーム33の水平移動領域とは、部分的にオーバーラップするので、各アームの取り付け高さ位置を違えてある。

【0019】本体架台の作業面5には、未使用の多数の分注用チップ15を載置した3個のチップラック14a、14b、14cが所定エリアにセットされる。これらのチップラック14は、図5に示すように、各分注用チップ15を挿入し得る穴を有しており、分注用チップの先端が作業面5又はチップラック底面に接触しないような高さを持った箱形をなす。各チップラック14a、14b、14cは夫々最大48本までの分注用チップ1

5を保持できる。

【0020】また、作業面5には、未使用の多数の核酸捕捉用チップ31を載置したチップラック30が所定エリアにセットされる。チップラック30の形状は、先のチップラック14と同様である。この例ではチップラック30上に最大48本までの核酸捕捉用チップ31を保持できる。

【0021】作業面5には、処理対象となる検体、すなわち核酸を含有する試料を収容した検体容器13が複数本ずつ保持される検体ラック12が所定エリアにセットされる。この例では、各検体ラック12は6本の検体容器13を保持できる。また、検体ラック12は8個またはそれ以上の数をセットできる。

【0022】また、作業面5には、未使用の処理容器24を多数保持した容器ラック23が所定エリアにセットされる。容器ラック23は、最大48本までの処理容器24を保持できる。さらに、作業面5には、未使用の精製品用容器26を多数保持した容器ラック23が所定エリアにセットされる。この精製品用容器は、精製処理がなされた核酸含有液を試料別に回収するものである。この例では、容器ラック25は、最大48本の精製品用容器26を保持できる。

【0023】作業面5には、プライミングの際に分注ノズル36から放出される水を受け入れると共に分注ノズル36のホームポジションとなる液受け部11と、分注作業をする分注チップ15を洗浄するための洗浄部18と、分注ノズル36に接続された分注用チップ15及び液体吸排用可動ノズル39に接続された核酸捕捉用チップ31を夫々のノズルから取り外すためのチップ外し器27と、プライミングの際に液体吸排用可動ノズル39から放出される水を受け入れると共に該可動ノズル39のホームポジションとなる液受け部28と、核酸捕捉用チップ31からの不要な液を排出するための廃液口29とが設けられる。

【0024】また、作業面5上の夫々の所定位置には、核酸捕捉用チップ31内の固相を洗浄するための洗浄液を収容した洗浄液ボトル19、固相に結合された核酸を溶出させるための溶離液を収容した溶離液ボトル20、希釈液を収容した希釈液ボトル21、及び固相への核酸の結合を促進する結合促進物質の溶液を収容した結合促進剤ボトル22等がセットされる。図5に示すシリンジポンプ10と図4に示すシリンジポンプ32は、それぞれ本体架台に取り付けられており、液体の吸入動作と吐出動作の制御が各ポンプ独自になされる。図5に示すように、ノズルホルダー17に保持された分注ノズル36は、可撓性の管42を介して液体吸排用のシリンジポンプ10に連通されている。分注ノズル36内及び管42内には純水が満たされており、シリンジポンプ10は図示しない純水供給源に接続されている。図4に示すように、ノズルホルダー34に保持された可動ノズル39

は、可撓性の管35を介してシリンジポンプ32に接続されている。可動ノズル39内及び管35内には純水が満たされており、シリンジポンプ32は図示しない純水供給源に接続されている。

【0025】分注ノズル36への分注用チップ15の接続のための装着及び可動ノズル39への核酸捕捉用チップ31の接続のための装着は、それぞれに対応するチップラック14、30上において、各ノズルを降下してチップをノズルの先端に嵌合することにより達成される。また、分注ノズル36に接続された分注用チップ15及び可動ノズル39に接続された核酸捕捉用チップ31をそれぞれのノズルから取り外す場合は、チップ外し器27を利用する。図1及び図6に示すように、チップ外し器27は、所定高さ位置に板状部材を有しており、この板状部材には、分注チップ15の頭部52及び核酸捕捉用チップ31の頭部54の外径よりも小さく、且つ分注ノズル36及び可動ノズル39の外径より大きな幅のスリット55が形成されている。スリット55が位置する高さよりも各チップの頭部52、54が低い状態でノズル36、39をスリット内に浸入するように水平移動させ、次いでノズルホルダー17、34を上昇させると頭部52、54が板状部材の下面に当接し、ノズルホルダーの更なる上昇によりチップ15、31がノズルから抜け落ちる。抜け落ちたチップは、チップ廃棄口50（図1）に落下し回収箱（図示せず）内に回収される。

【0026】図3に、図1の核酸精製装置の電気系の構成を示す。動作制御部としてのパーソナルコンピュータ（PC）60には、操作条件及び検体情報を入力するための操作パネルとしてのキーボード61、入力情報や警告情報等を表示するための表示装置としてのCRT62、装置の各機構部を制御する機構制御部65等が接続される。機構制御部65は、シリンジポンプ10に吸排動作を行わせるためのピストン駆動用のステッピングモータ71、シリンジポンプ32に吸排動作を行わせるためのピストン駆動用のステッピングモータ72、ノズルホルダー17を水平移動及び上下動させるためのステッピングモータ73、ノズルホルダー34を水平移動及び上下動させるためのステッピングモータ74、アーム16を水平移動させるためのACサーボモータ75、アーム33を水平移動させるためのACサーボモータ76等を制御する。精製装置の各部は、所定のプログラムに従って動作される。

【0027】図7に、核酸捕捉用チップ31の1つの例の構成を示す。核酸捕捉用チップ31は、頭部54が可動ノズル39の先端に気密に嵌合される内径を有しており、下方が先端48に向けて徐々に内径が細くなるように形成される。チップ31は透明もしくは半透明な合成樹脂からなる。チップ31の先端側には、固相が流出することを防止するための円板状の阻止部材40bを圧入により挿入し、頭部54の側には円板状の阻止部材40

aを設ける。これらの阻止部材40a, 40bは、液体及び気体が容易に通過し得る多数の孔を有するが、その孔は固相の流出を阻止できる大きさである。阻止部材40a, 40bの材質としては、非特異吸着が少なく親水性を有するポリビニリデンフロライドを用いる。この材質は、タンパク質や核酸等の非特異吸着を少なくできるので、核酸の精製度や収率への影響が小さい。阻止部材40aは、チップ31への挿入を容易にするための突起状の挿入用補助ガイド37を下面側に複数個有する。阻止部材40aと40bによって挟まれた部屋には、固相としてフリントガラス（和光純薬工業 製）の粉末44を充填する。このフリントガラスはシリカ含有量が高い。

【0028】次に、図1の実施例による核酸の精製操作を説明する。

【0029】核酸含有試料の精製操作を開始する前に、市販の精製品であるpBR322DNA（Fermentas 社製）をトリス-EDTA緩衝液（pH7.5, TE溶液）により所定濃度にした溶液を調製し、検体容器13に入れて検体ラックに保持させ、図1の装置100上の検体エリアにセットした。分注チップ15を有するチップラック14、核酸捕捉用チップ31を有するチップアック30、各ボトル19、20、21、22、処理容器24を有する容器ラック23、及び精製品用容器26を有する容器ラック25を、それぞれ所定の場合にセットした後、精製用装置100による操作を開始した。

【0030】まず、ノズルホルダー17を動作させ、液受け部11に位置していた分注ノズル36を検体用のチップラック14a上へ移動し、第1番目の分注用チップを分注ノズル36に嵌合する。次いで、取り付けた分注用チップ15を結合促進剤ボトル22上へ移動し、該ボトル内へ降下し、シリンジポンプ10に吸引動作させることにより分注用チップ15内に所定量の塩酸グアニジン溶液を吸入する。分注用チップを結合促進剤ボトル22内から上昇させ、分注用チップの先端に少量の空気を引入し、洗浄部18へ移動して分注用チップの外壁に洗浄水を噴射させることにより分注用チップ15の外壁を洗浄する。次いで、分注ノズル36を検体ラック12上の第1番目の検体容器13まで移動し、分注用チップ15を検体容器内に降下し、シリンジポンプ10の吸引動作により分注用チップ15内に所定量の検体を吸入する。これにより、分注用チップ15内には、塩酸グアニジン溶液、空気、及び核酸含有試料液の各層が形成される。

【0031】検体を吸入した分注用チップ15を容器ラック23上の第1番目の処理容器24上へ移動し、その処理容器24へ分注用チップ15内の検体及び塩酸グアニジン溶液の全量を吐出する。その吐出後に再び吐出液の全量を同じ分注用チップ15内に吸入し、更に第1番目の処理容器24へ吐出することを1回以上行う。これ

により核酸含有試料と結合促進剤を混合する。その後、分注ノズル36をチップ外し器27まで移動し、上述した取り外し動作に従って、分注ノズル36から使用済みの分注用ノズル15を取り外す。次いで、分注ノズル36を液受け部11の位置に戻し、分注ノズル36から純水を所定量吐出させた後、分注ノズル36の先端に少量の空気を吸入し、ノズルホルダー17に対する次の動作指令があるまで待機する。

【0032】分注ノズル36が混合動作を行っている間に、アーム33及びノズルホルダー34の動作により液体吸排用可動ノズル39を、液受け部28からチップラック30上の第1番目の核酸捕捉用チップ31の位置へ移動し、可動ノズル39の先端に核酸捕捉用チップ31を嵌合する。その後、可動ノズル39は核酸捕捉用チップ31を結合した状態で容器ラック23上の第1番目の処理容器24の位置へ移動し、核酸捕捉用チップ31を降下し、そのチップ内に、第1番目の処理容器に入っている検体と結合促進剤の混合液の全量を、シリンジポンプ32の吸引動作により核酸捕捉用チップ31内に吸入する。これにより混合液がチップ31内の固相としてのガラス粉末44の表面に接触する。次いで、吸入した混合液を第1番目の処理容器24内に吐出して戻し、吐出された混合液を再び同一の核酸捕捉用チップ31内に吸入する。この混合液の吐出と吸入を複数回繰り返すことにより固相表面と混合液との接触数を増大し、固相による核酸の吸着効率を高める。

【0033】所定回数の吸排の後に最終的に第1番目の核酸捕捉用チップ31内へ混合液の全量を吸入し、該チップ31を廃液口29へ移動して核酸吸着後の残液を、シリンジポンプ32の吐出動作により廃液口29内へ排出する。核酸捕捉用チップ31を接続した状態の可動ノズル39は、液受け部28の位置へ移動され、ノズルホルダー34に対するその後の動作指令があるまで液受け部28の位置で待機する。

【0034】核酸捕捉用チップ31が混合液の吸排を行っている間に、ノズルホルダー17に対し次の動作指令が出される。すなわち、分注ノズル36を液受け部11の位置からチップラック14b上の第1番目の分注用チップの位置へ移動し、分注ノズル36を降下してその先端に第1番目の分注用チップを嵌合する。核酸捕捉用チップ31が廃液口29へ移動されるまでの間に、分注用チップ15を接続した分注ノズル36を洗浄液ボトル19の位置へ移動し分注用チップ内に複数回使用するための所定量の洗浄液を吸入する。次いで、混合液が吸入されて空になっている容器ラック23上の第1番目の処理容器24上に分注ノズル36を移動し、シリンジポンプ10の押し出し動作により第1番目の処理容器24内に分注用チップ15から洗浄液の一部（1回分の量）を吐出する。洗浄液の吐出後に分注用チップ15を液受け部11に移動し待機させる。

【0035】続いて、液受け部28上で待機していた核酸捕捉用チップ31を洗浄液が入れた第1番目の処理容器24に移動し、シリンジポンプ32の吸引動作により核酸捕捉用チップ31内に処理容器24の洗浄液を吸入する、一旦吸入した洗浄液は、第1番目の処理容器24に吐出され、再度チップ31内に吸入される。この吐出と吸引を2回繰り返した後、最終的にチップ31内に吸入した状態で可動ノズル39を廃液口29へ移動し、使用済みの洗浄液を廃液口29内へ排出する。このような洗浄動作により、核酸捕捉用チップ31の内壁及び固相の表面が洗浄される。次いで、液受け部11で待機していた分注用チップ15を第1番目の処理容器24へ移動し、分注用チップ15内に保持されている洗浄液の一部又は全部を第1番目の処理容器内に吐出する。洗浄液を吐出済みの分注用チップ15はチップ外し器27の位置へ移動され、分注ノズル36から取り外される。第1番目の処理容器24に新たに加えられた洗浄液は、核酸捕捉用チップ31内に吸入され、2回目の洗浄を行う。この2回目の洗浄操作は1回目の洗浄操作と同様のステップを経る。必要であれば、3回目の洗浄操作を行うようにすることができる。洗浄液を廃液口29へ排出して洗浄操作が終了した核酸捕捉用チップ31は、液受け部28へ移動し、待機する。なお、洗浄液は、濃度が70%のエタノール水溶液である。

【0036】核酸の溶離工程に当り、分注ノズル36がチップラック14c上の第1番目の分注用チップの位置へ移動され、分注ノズル36の降下により該ノズル36の先端に分注用チップ15を嵌合する。分注用チップを接続した分注ノズル36は溶離液ボトル20の位置へ移動する。溶離液ボトル20内には、溶離液としての純水が収容されている。望ましくは、溶離液ボトル20が加温されている。シリンジポンプ10の吸引動作により、分注用チップ15内に、複数回使用し得る量の溶離液が吸入される。続いて分注用チップ15は容器ラック23上の第1番目の処理容器24上へ移動され、シリンジポンプ10の押し出し動作により、分注用チップ15から1回分の量の溶離液を第1番目の処理容器24内に吐出する。残りの量の溶離液を保有している分注用チップ15は、液受け部11へ移動し、待機する。

【0037】液受け部28で待機していた核酸捕捉用チップ31を容器ラック23上の第1番目の処理容器24へ移動し、溶離液が入っている第1番目の処理容器24内の溶離液を核酸捕捉用チップ31内に吸入する。これにより溶離液が固相に接触し、固相表面に吸着されていた核酸を溶離液中に溶出させる。チップ31内に吸入した溶離液を元の処理容器24へ吐出した後、再度同一チップ31内に吸入する操作を所定回数繰り返して、最終的に溶離液を吸入保持した核酸捕捉用チップ31を、容器ラック25上の第1番目の精製品用容器26の位置へ移動する。シリンジポンプ32の押し出し動作により核酸

捕捉用チップ31内にあった溶離液を第1番目の精製品用容器26内に吐出する。これにより精製品容器26には、固相から溶出された核酸を含む溶離液が回収される。溶離液吐出後の核酸捕捉用チップ31は液受け部28へ移動され待機する。

【0038】次いで、溶離液を保持した状態の分注用チップ15が、液受け部11から第1番目の処理容器24へ移動し、次の1回分の溶離液を該処理容器内へ吐出する。続いて、液受け部28にて待機していた核酸捕捉用チップ31を第1番目の処理容器24へ移動し、処理容器24内の溶離液を核酸捕捉用チップ31内に吸入し、上述したと同様の核酸溶出操作を実行した後、核酸を含む溶離液を第1番目の精製品用容器26内に回収する。このような分注用チップ15による溶離液の供給操作と核酸捕捉用チップ31による溶出操作は、所定回数、例えば3回繰り返される。溶離液の吐出を終了した分注用チップ15は、チップ外し器27へ移動し、分注ノズル36から使用済みの分注用チップ15を取り外す。分注用チップを外した分注ノズル36は、液受け部11へ移動し、ノズル先端から水を吐出した後、ノズル先端に微量の空気を吸入し、その位置で待機する。また、精製品用容器26への核酸含有溶離液の複数回の吐出を終了した核酸捕捉用チップ31は、チップ外し器27へ移動し、可動ノズル39から使用済みの核酸捕捉用チップ31を取り外す。核酸捕捉用チップを外した可動ノズル39は、液受け部28へ移動し、ノズルから所定量の水を吐出した後、ノズル先端に微量の空気を吸入し、その位置で待機する。

【0039】以上で、第1番目の検体に対する核酸の精製操作が終了する。このあと、図1の精製用装置100は、第2番目以降の検体に対し核酸精製操作を続行するが、その操作は上述した例の繰り返しである。なお、第1番目の検体に対しては、各分注ラック14a、14b、14c上の第1番目の分注用チップと、チップラック30上の第1番目の核酸捕捉用チップと、容器ラック23上の第1番目の処理容器24と、容器ラック25上の第1番目の精製品用容器を用いたが、第2番目の検体に対しては、これらの第2番目の部品がそれぞれ使用され、第3番目以降の検体に対しても同様に部品が変更される。従って、容器ラック25上の精製品容器列には、検体の順番に応じて、精製回収された核酸含有液が検体別に回収される。これらの部品は、検体毎に新しいものが使用されるので、検体相互間のコンタミネーションが防止される。

【0040】次に、核酸捕捉用チップの他の構成例を説明する。図8の核酸捕捉用チップ31aは、その内部にチップ31aの先端内径よりも大きな外形になるように焼結して形成した複数のシリカ焼結ブロック45を固相として保有する。核酸捕捉用チップ31aの頭部側には、固相の流出を防止するための円板状の阻止部材40

cが圧入固定されている。この阻止部材40cの材質は図7のものと同じである。

【0041】図9の核酸捕捉用チップ31bは、その内部に石英ウール46を固相として保有する。核酸捕捉用チップ31bの先端側には円板状の阻止部材40dが圧入され、頭部側には阻止部材40cが圧入されている。これらの阻止部材も液体及び気体の流通が自由な多数の小孔が形成されており、材質はポリビニリデンフロライドからなる。

【0042】次に、図7～図9に示す各々の核酸捕捉用チップを用い、図1の精製用装置により市販の核酸精製品を処理した場合の、核酸の回収率に関する実験例を説明する。処理用試料としては、pBR322 DNA (Fermentas 社製) をトリス-EDTA緩衝液により所定濃度に調製したものをを用いた。図1の装置による洗浄工程では処理容器24に対し所定量の洗浄液を2回供給し、溶離工程では処理容器24に対し所定量の溶離液(純水)を2回供給した。核酸捕捉用チップの種類が異なるように用いた試料毎に、それぞれ別の精製品用容器26に回収した回収液について電気泳動測定をした。電気泳動には0.8%アガロースゲルを用い、エチジウムブロマイド染色後に、各バンドの強度をデンストグラフ(ATTO 社製)により数値化し、処理操作前後の核酸量に基づいて回収率を算出した。

【0043】実験結果によれば、核酸回収率は、図7のチップを用いた場合が87%、図8のチップを用いた場合が52%、図9のチップを用いた場合が80%であった。図1の精製用装置による処理時間は1検体当たり約10分である。

【0044】次に、核酸の種類もしくは性状と、回収率との関係に関する実験例を説明する。市販精製品のλDNA (48502塩基長の2本鎖直鎖状DNA、Fermentas 社製)、pBR322 DNA (4361塩基長の2本鎖環状DNA、Fermentas 社製)、MS2 RNA (3569塩基長の1本鎖直鎖状RNA、ペーリンガー・マンハイム 社製) をTE溶液により所定の濃度とした容液を検体として、検体ラック12に保持させ、その検体ラックを図1の装置上にセットした。図7の核酸捕捉用チップを用い、上述の実験例と同様の工程により、DNAの自動回収を行った。それぞれの検体毎に回収した精製品用容器26内に得られた核酸溶液の一部分を用いて、0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後に、各バンドの強度をデンストグラフ(ATTO 社製)により数値化し、操作前後の核酸量に基づき回収率を算出した。結果は、λDNAが68%、pBR322が86%、MS2 RNAが78%であった。核酸の性状により多少の差異は見られるが、本発明を用いることで、簡便に高回収率で核酸の回収が可能であることが分かる。

【0045】次に、血清が共存する場合のDNAの精製

状態を確認するための実験例を説明する。ヒトの血清に市販精製品のλDNA (Fermentas 社製) を添加し、ヌクレアーゼ対策、及び、実使用条件に近づけるためにドデシル硫酸ナトリウム(終濃度で1%)を添加したものを検体として、図7の核酸捕捉用チップを用いて上述の実験例と同様の工程により、DNAの自動回収を行った。

【0046】各精製品用容器26内に回収された核酸回収液に対しPCR処理を行った。PCR処理時の試薬の宝酒造(株)製のPCR専用試薬キットを使用し、キットに付随のλDNA用コントロールプライマーにより、λDNA中の特定の500塩基の増幅を試みた。PCR処理時の遺伝子増幅システムは宝酒造(株)製のTP3000を使用し、94℃の熱変性30s、68℃のアニールと伸長反応30sを25回繰り返す、更に68℃で7min加温しPCRを行った。PCR処理後に、1.5%のアガロースゲルにより電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色を行った。

【0047】図1の精製用装置による精製処理をせずにそのままの検体をPCR処理した場合をAとし、図1の精製用装置により精製処理をした後にPCR処理した場合をBとし、前記市販精製品のλDNAを血清と混合せずにBの場合の検体と同じ核酸濃度になるように調製したものをPCR処理した場合をCとして比較した。実験結果によれば、Aではドデシル硫酸ナトリウム(SDS溶液)等の阻害により目的とするDNA断片が得られなかったのに対し、BではCの場合と同等のDNA断片が得られた。これにより、血清が共存する試料に対する核酸の精製が、図1の精製用装置でなされることを確認できた。

【0048】次に、培養した遺伝子組換え大腸菌からのプラスミドDNAを精製によって回収するための実験例を説明する。図1の精製用装置にセットすべき試料を準備するために前処理が必要である。この前処理では、大腸菌HB101株に対して、pBR322 DNAを遺伝子工学的に組み込んだ大腸菌をLB培地1ml中で、37℃で一晩培養し、遠心分離により集菌し、100μlの0.15mol/l NaClに懸濁させ、大腸菌の細胞壁中のペプチドグリカン破壊するために、50mmol/l グルコース、10mmol/l EDTA、25mmol/l Tris-HCl (pH 8.0)に8mg/mlとなるようにリゾチームを加えた溶液を添加、混合し、更に、0.2mol/l NaOH、1% SDS溶液を添加し、一定時間放置後、この溶液に5mol/l 酢酸カリウムを添加することにより、対象試料を得た。

【0049】前処理済みの試料を検体ラック12に収納し、図7の核酸捕捉用チップを用いて図1の精製用装置によりプラスミドDNAの精製操作を行った。精製品用容器26に回収された回収液について分光光度計により吸光度測定した結果、波長280nmの吸光度に対する波長

260nmの吸光度の比は、1.96であった。核酸の吸収波長が260nmであり、蛋白質の吸収波長が280nmであるので、吸光度比が1.8以上であれば核酸の精製度が高いといえる。さらに、精製用容器26内の回収液を検体として、0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色を行った。同時に流した移動量マーカーから、精製溶液からプラスミドDNAとrRNAが確認された。また、RNA分解酵素によるRNAの消化処理、及び、アルコール溶液による沈殿処理後のプラスミドDNA容器の260nmの吸光度から、得られたプラスミドDNAの収量は4.1 μ gであった。

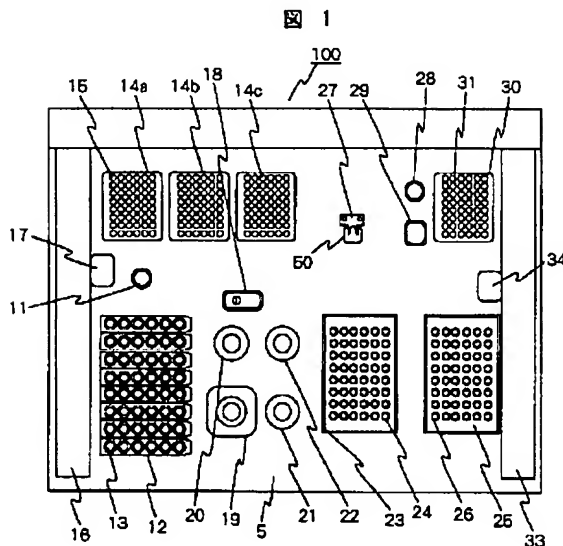
【0050】

【発明の効果】本発明によれば、核酸の精製操作を自動化することができ、且つ、核酸含有試料と固相との接触時間が十分に確保されるので、核酸を高い回収率で精製することができる。また、本発明によれば、固相への核酸の捕捉工程、核酸を捕捉した固相の洗浄工程、及び固相からの核酸の溶離工程を、固相内蔵の核酸捕捉用チップを可動ノズルに接続したままの状態で行うことができるので、精製操作を簡易に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例である核酸精製用装置の平面図である。

【図1】



【図2】図1の核酸精製用装置の概略外観図である。

【図3】図1の実施例における電気系の構成を示すブロックダイアグラムである。

【図4】図1の実施例における核酸捕捉用チップを接続した分注器の概略構成を示す図である。

【図5】図1の実施例における液体分注用チップをノズルに取り付ける動作の説明図である。

【図6】図1の実施例におけるノズルからチップを取り外す動作の説明図である。

【図7】図1の実施例における核酸捕捉用チップの概略構成図である。

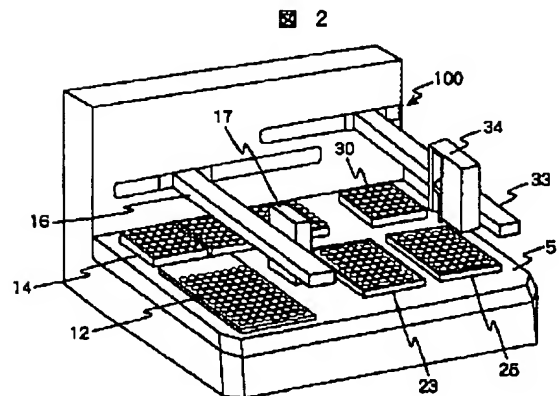
【図8】核酸捕捉用チップの他の例を示す図である。

【図9】核酸捕捉用チップのもう1つの例を示す図である。

【符号の説明】

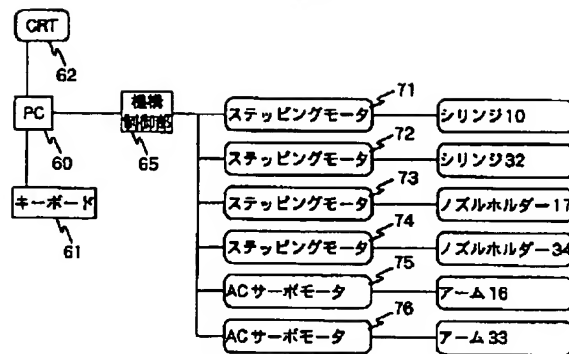
10, 32…シリンジポンプ、12…検体ラック、15…分注用チップ、16, 33…アーム、17, 34…ノズルホルダー、19…洗浄液ボトル、20…溶離液ボトル、22…結合促進剤ボトル、24…処理容器、26…精製品用容器、27…チップ外し器、31, 31a, 31b…核酸捕捉用チップ、36…分注ノズル、39…液体吸排用可動ノズル、40a, 40b, 40c, 40d…阻止部材、44…ガラス粉末、45…シリカ焼結ブロック、46…石英ウール、100…精製用装置。

【図2】



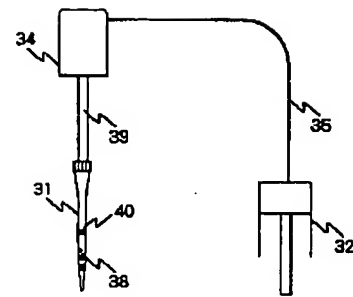
【図 3】

図 3



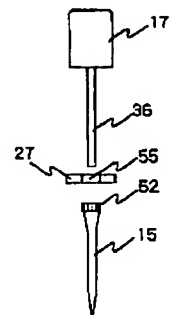
【図 4】

図 4



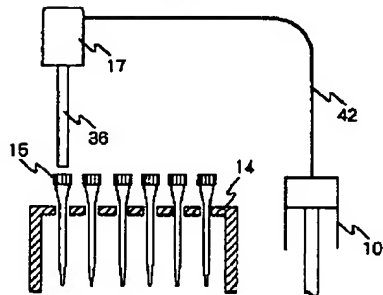
【図 6】

図 6



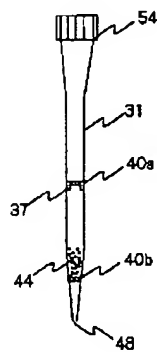
【図 5】

図 5



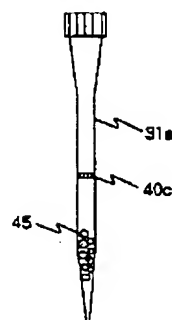
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



【図 9】

図 9

